

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
Please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 681 786**

②① N° d'enregistrement national :

**91 11947**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : A 61 K 31/70; C 12 N 15/63

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 27.09.91.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public —  
FR.

⑦② Inventeur(s) : Perricaudet Michel, Briand Pascale et  
Stratford-Perricaudet Leslie.

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 02.04.93 Bulletin 93/13.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.

⑤④ Vecteurs recombinants d'origine virale, leur procédé d'obtention et leur utilisation pour l'expression de polypeptides dans des cellules musculaires.

⑤⑦ L'invention concerne l'utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée secrétées par lesdites cellules musculaires.

L'invention concerne également un procédé d'obtention de ces vecteurs, et des vecteurs tels que décrits ci-dessus et leur utilisation dans des compositions pharmaceutiques.

**FR 2 681 786 - A1**



**VECTEURS RECOMBINANTS D'ORIGINE VIRALE, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION ET LEUR UTILISATION POUR L'EXPRESSION DE POLYPEPTIDES DANS DES CELLULES MUSCULAIRES.**

L'invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale comportant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé, et leur utilisation pour l'expression de ce polypeptide dans des cellules musculaires. L'invention vise également un procédé d'obtention de ces vecteurs, ainsi que leurs applications, notamment en tant que médicaments dans le domaine des pathologies musculaires.

Le problème, non résolu jusqu'à maintenant, de la diffusion directe d'un gène vers un tissu spécifique, fait obstacle au développement de la thérapie génique dans le domaine des maladies musculaires.

Les diverses tentatives de modification du tissu musculaire réalisées jusqu'à ce jour sont principalement celle de la fusion de cellules musculaires avec un muscle hôte (Salminen, A., et al., Hum. Gene Ther. 2, 15-26 (1991); Partridge, T.A., et al., Nature 337, 176-179 (1989)), et celle procédant par injection d'ADN directement dans les muscles (Wolff, J.A. et al. Science 247, 1465-1468 (1991); Acsadi, G., New Biol. 3, 71-81 (1991)).

La méthode procédant par fusion, chez des souris, de précurseurs de cellules musculaires provenant d'un donneur normal, avec des fibres musculaires d'un hôte (Partridge, T.A., et al. cité ci-dessus) a été réalisée avec succès et cette thérapie cellulaire a fait l'objet d'essais préliminaires chez des enfants. Toutefois, cette approche semble présenter trop d'inconvénients pour être applicable au traitement de pathologies musculaires. En effet, les capacités de migration de ces précurseurs de cellules étant

réduites à quelques millimètres, l'implantation cellulaire de ces derniers nécessiterait des millions d'injections pendant des heures d'anesthésie. De manière inévitable, des problèmes immunologiques, conduisant à des phénomènes de rejet, risqueraient d'apparaître, comme dans le cas de nombreuses greffes. De plus le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) nécessite non seulement d'atteindre les muscles du squelette, mais également les cellules myocardiques; on imagine aisément les difficultés susceptibles d'être rencontrées pour implanter des précurseurs de cellules musculaires dans le myocarde. La thérapie cellulaire semble par conséquent peu appropriée pour le traitement de cellules malades présentant une telle dissémination dans l'organisme.

La thérapie génique par introduction directe in vivo d'acides nucléiques à l'intérieur d'organes, est une méthode attrayante en raison de sa simplicité, mais dont le développement se heurte à un certain nombre d'obstacles. En particulier, l'expression de gènes dans les muscles reste localisée au point d'injection (Wolff, J.A., et al. cité ci-dessus) et semble être assez limitée dans le temps, particulièrement dans le muscle cardiaque (Acsadi, G. et al., cité ci-dessus).

Le but de la présente invention est précisément de permettre l'introduction d'un très grand nombre d'acides nucléiques dans un nombre important (jusqu'à 50 % et plus) de cellules musculaires d'un organisme humain ou animal, que ces cellules musculaires soient celles des muscles du squelette ou encore celles du myocarde.

La présente invention a plus particulièrement pour but de permettre l'acheminement de ces acides nucléiques vers les cellules musculaires cibles par la circulation sanguine, tout en protégeant ces acides

nucléiques de l'agression de divers constituants sanguins.

Un autre but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions pharmaceutiques permettant le traitement des maladies musculaires, et plus particulièrement des pathologies génétiques du système musculaire, ou encore de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression des acides nucléiques sus-mentionnés, ces produits étant sécrétés par lesdites cellules musculaires.

La présente invention découle de la découverte faite par les inventeurs, du fait que l'on retrouve l'activité  $\beta$ -galactosidase dans de nombreux tissus après injection à des souris de vecteurs recombinants d'origine virale, plus particulièrement d'adénovirus, dans le génome desquels a été inséré le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Parmi ces tissus, on peut citer les poumons, le foie, l'intestin, le coeur et les muscles du squelette. L'expression du gène de la  $\beta$ -galactosidase est constante dans le temps, puisque la proportion des cellules de couleur bleue (coloration obtenue à la suite de l'expression de ce gène) dans le tissu musculaire est à peu près équivalente d'un mois à un autre.

La figure 1 représente un exemple de construction d'un vecteur recombinant selon l'invention et correspondant à l'adénovirus de type Ad5 dans le génome duquel est inséré le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV.

La présente invention a pour objet l'utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique

codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée et secrétés par lesdites cellules musculaires.

Les adénovirus, notamment les adénovirus humains de type 2 ou 5 représentent des vecteurs particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, en raison notamment de la grande taille du fragment d'ADN étranger qu'il est possible d'insérer dans le génome de ces virus.

Avantageusement, l'acide nucléique d'insertion sus-mentionné est compris dans un génome défectif d'adénovirus, ce génome étant dépourvu de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB; ce génome comprend néanmoins préférentiellement l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

La quantité de vecteurs administrée dans l'organisme est avantageusement choisie de manière à déborder le système immunitaire de l'organisme dans lequel ils sont injectés.

Avantageusement la voie d'administration choisie dans le cadre de la présente invention est la voie intraveineuse.

Parmi les pathologies affectant des cellules musculaires sus-mentionnées, on peut citer des pathologies génétiques telles que la dystrophie musculaire.

A ce titre l'acide nucléique inséré dans le génome du vecteur viral, et dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, comprend un séquence nucléotidique codant pour un polypeptide susceptible de traiter la pathologie en question, et plus particulièrement de jouer le rôle dans la cellule musculaire du polypeptide normalement présent dans une cellule saine, mais dont la déficience est due soit à une production anormalement faible, voire nulle, de ce polypeptide, soit à une erreur dans sa séquence en acides aminés résultant d'anomalies d'ordre génétique dans sa séquence nucléotidique codante.

Des vecteurs, selon l'invention, utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la dystrophie musculaire, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine. L'introduction du gène entier de la dystrophine, ou encore de toute partie de ce gène codant pour un polypeptide conservant une activité comparable à celle de la protéine entière, peut être réalisée suivant une méthode identique à celle décrite ci-après pour l'introduction du gène de la  $\beta$ -galactosidase.

A titre d'exemple de pathologies autres que les pathologies musculaires, susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer les thromboses à l'origine des infarctus ou encore des phlébites.

Des vecteurs selon l'invention utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des thromboses et à la prévention des infarctus et des phlébites, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion comprend une séquence nucléotidique codant pour une substance thrombolytique. Cette dernière séquence est avantageusement précédée d'une séquence signal codant

pour un peptide, signal assurant la sécrétion de la substance thrombolytique hors de la cellule musculaire.

L'invention vise également tout vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

Un vecteur recombinant préféré de l'invention est caractérisé en ce que cet acide nucléique recombinant est constitué de tout ou partie du gène de la dystrophine.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention des vecteurs recombinants décrits ci-dessus qui comprend après l'étape de construction proprement dite de ces vecteurs par introduction de l'acide nucléique d'insertion dans leur génome, une étape de transformation de lignées cellulaires transformables d'eucaryotes supérieurs (notamment d'origine humaine ou animale) comportant elles-mêmes une séquence distincte de nucléotides apte à compléter la partie du génome de l'adénovirus essentielle pour la répllication de ce dernier et dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence



distincte étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A titre d'exemple préféré de telles lignées cellulaires, on mentionnera la lignée 293, lignée de rein embryonnaire humain qui contient, intégrés dans son génome, les onze premiers pourcents de l'extrémité gauche du génome d'un Ad5. Ceux-ci permettent de compléter des virus recombinants défectifs qui portent des délétions de cette région. Un tel procédé d'obtention est plus particulièrement décrit dans la demande de brevet européen n° 0 185 573 du 20/11/85.

Après transformation de ces lignées cellulaires, les vecteurs qui se sont ainsi multipliés sont récupérés et purifiés.

La présente invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la construction d'adénovirus vecteurs recombinants comportant le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, et des propriétés de cet adénovirus vecteur.

1. Construction de l'adénovirus recombinant, Ad-RSV- $\beta$ gal, par recombinaison in vivo.

Cet adénovirus recombinant a été construit par recombinaison homologue entre un plasmide approprié et le génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5). Dans cette construction, le gène de la  $\beta$ -galactosidase est placé sous le contrôle du promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus). Le plasmide pAdRSV $\beta$ gal utilisé contient le segment PvuII de l'extrémité gauche de l'Ad5 (segment situé entre les positions 0 et 1,3 du plasmide sur la figure 1) comprenant la répétition terminale intervertie, l'origine de répllication, des signaux d'encapsidation, et l'amplificateur Ela. Ce fragment est suivi par un gène nls lacZ (décrit dans Bonnerot, C. et al., Proc. natn. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 6795-6799) codant pour la  $\beta$ -galactosidase, et par un

fragment de l'adénovirus Ad5 situé entre les positions 9,4 et 17 du plasmide de la figure 1.

Les valeurs des positions 1,3, 9,4 et 17 indiquées ci-dessus sont des unités indiquant le nombre de paires de base comprises à l'intérieur de ces fragments, une unité représentant 360 paires de base.

La séquence d'Ad5 située entre les positions 9,4 et 17 sus-mentionnées permet la recombinaison avec l'adénovirus dl324 traité par l'enzyme de restriction ClaI (correspondant à un mutant de délétion E3; la délétion étant effectuée entre les positions 78,4 et 84,3 du génome de l'adénovirus représenté sur la figure 1), après transfection de cellules 293 (cellules embryonnaires humaines de rein transformées par l'adénovirus et mentionnées ci-dessus) afin de générer le vecteur recombinant Ad-RSV- $\beta$ gal. Le gène nslacZ est contrôlé par le promoteur RSV LTR et possède le signal de polyadénylation du virus SV40. Le virus recombinant ainsi obtenu est incapable de se répliquer en raison de la délétion des gènes E1.

2. Etude du transfert du gène par l'intermédiaire de l'adénovirus aux organes de souris.

Des souris Balb/C âgées de 4 jours ont subi une injection intra-veineuse de 20-40 microlitres d'adénovirus recombinants hautement purifiés, Ad-RSV- $\beta$ gal ( $10^9$  unités formant des plages : UFP/ml) les organes ont été prélevés 15 jours après injection et traités avec du paraformaldéhyde 4% dans un tampon phosphate pendant 30 minutes. Après rinçage les organes ont été incubés pendant une nuit à 30°C dans une solution X-gal. Les organes entiers ont ensuite été congelés et préparés de manière appropriée pour effectuer des cryosections (de 10 micromètres d'épaisseur), sections qui ont été colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine.

La mise en évidence par coloration histochimique de la manière indiquée ci-dessus de l'activité  $\beta$ -galactosidase sur les sections effectuées indique la présence dans les cellules des organes prélevés du gène inséré dans l'adénovirus vecteur.

L'examen macroscopique du coeur ainsi que des muscles du squelette prélevés sur ces souris traitées, révèle la grande efficacité avec laquelle a été effectué ce transfert de gène après seulement une injection de l'adénovirus recombinant. L'intérêt du choix de la voie intraveineuse réside dans le fait que le vecteur viral n'est pas concentré dans une zone quelconque du tissu musculaire mais au contraire qu'il est favorablement dispersé dans l'ensemble de la masse musculaire. La coloration histochimique permet d'estimer que le nombre de cellules transformées atteint dans certaines zones 50 % du nombre de cellules musculaires présentes dans cette zone.

L'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans le myocarde ainsi que dans les muscles du squelette est parfaitement stable. Des colorations positives ont pu être observées 15,33,55,66,90,127 et 150 jours après l'injection de l'adénovirus recombinant. L'expression du gène semble constante en fonction du temps, puisque la proportion de cellules bleues dans les tissus musculaires semblent à peu près équivalente d'un mois à l'autre.

L'analyse de fibres musculaires isolées révèle qu'une seule fibre est susceptible de présenter de nombreux "centres d'expression".

Des analyses par immunotransfert (Southern) réalisées à partir du coeur d'une souris traitée ont permis de mettre en évidence une bande intense et unique correspondant à 35 Kpb indiquant que l'ADN viral introduit dans les cellules musculaires est essentiellement extrachromosomique.

**REVENDICATIONS**

1. Utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique susmentionnée secrétés par lesdites cellules musculaires.

2. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1, caractérisée en ce que ces vecteurs sont choisis parmi les adénovirus défectifs dont les génomes sont dépourvus de séquences essentielles nécessaires à la réplication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB.

3. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est compris dans un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

4. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine.

5. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 4, pour l'obtention d'un médicament

destiné au traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

6. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 5, par voie intra-veineuse.

7. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

8. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce que cet acide nucléique recombinant est constitué de tout ou partie du gène de la dystrophine.

9. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 7 ou la revendication 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

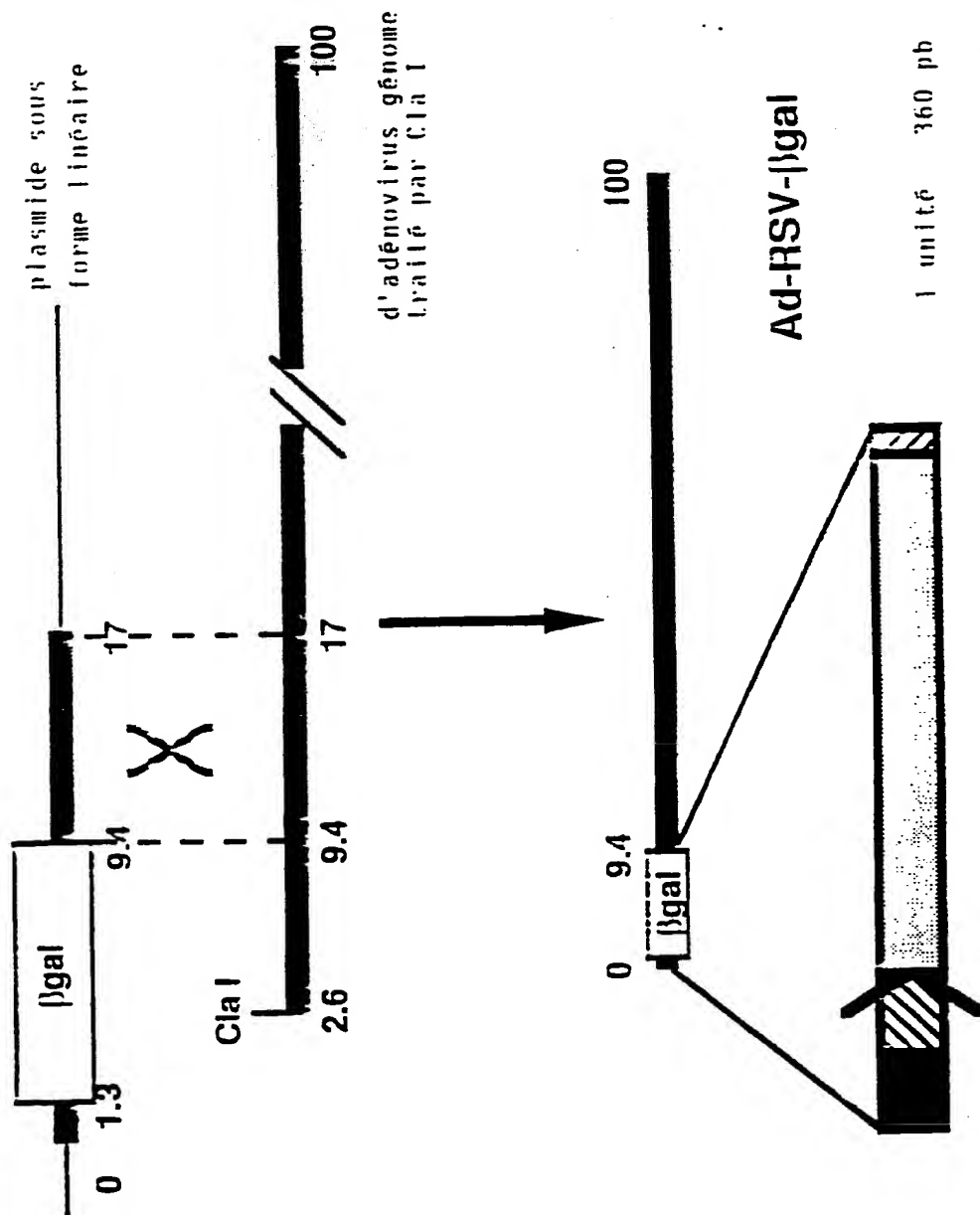


Figure 1

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9111947  
FA 462796  
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER, INTERNATIONAL WORKSHOP) vol. 219, 11 Avril 1991, PARIS, FRANCE pages 271 - 272; QUANTIN, B. ET AL.: 'Adenovirus as an expression vector in muscle cells application to dystrophin' * le document en entier *	1-9
Y	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER, INTERNATIONAL WORKSHOP) vol. 219, 11 Avril 1991, PARIS, FRANCE pages 51 - 61; STRATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M.: 'Gene transfer into animals : the promise of adenovirus' * le document en entier *	1-9
Y	WO-A-9 011 092 (VICAL, INC & WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) * page 6, ligne 28 - page 8, ligne 6 * * page 10, ligne 19 - page 11, ligne 34 * * page 12, ligne 15 - page 13, ligne 2; revendications 6,7,15-17; figures 2,4; exemples 11-15 *	1-9
D,Y	EP-A-0 185 573 (INSERM) * le document en entier *	1-9
Y	SCIENCE, vol. 252, no. 5004, 19 Avril 1991, LANCASTER, PA US pages 431 - 434; ROSENFELD, M.A. ET AL.: 'Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo' specially figure 1 * le document en entier *	1-6,8,9
Date d'achèvement de la recherche 13 MAI 1992		Examinateur CHAMBONNET F.J.
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		